

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

EP04112554



REC'D: 11 JAN 2005

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 52 511.4

**Anmeldetag:**

07. November 2003

**Anmelder/Inhaber:**Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald,  
17489 Greifswald/DE**Bezeichnung:**Verwendung von MRP4-Inhibitoren zur Behandlung  
und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen**IPC:**

A 61 K, A 61 P, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.****München, den 17. November 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag****Stanschus****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**UEXKÜLL & STOLBERG**

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4  
D - 22607 HAMBURG

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (-1992)  
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (-1998)  
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS  
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE  
DIPL.-ING. ARNULF HUBER  
DR. ALLARD von KAMEKE  
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER  
DR. PETER FRANCK  
DR. GEORG BOTH  
DR. ULRICH-MARIA GROSS  
DR. HELMUT von HEESCH  
DR. JOHANNES AHME  
DR. HEINZ-PETER MUTH  
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU  
DR. BERND JANSSEN  
DR. ALBRECHT von MENGES  
DR. MARTIN NOHLEN  
MÜNCHEN  
DIPL.-ING. LARS MANKE  
DR. OLGA BEZZUBOVA  
RECHTSANWÄLTE IN HAMBURG  
DR. FRANK DETTMANN  
ASKAN DEUTSCH, LL.M.

Ernst-Moritz-Arndt-Universität  
Greifswald

Domstr. 11

17487 Greifswald

November 2003  
P 64687 We/ap

Verwendung von MRP4-Inhibitoren zur Behandlung und/oder  
Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren des Multidrug-Resistenzproteins 4 (MRP4) in Thrombozyten zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen.

Die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Herzinfarkt, Schlaganfall und anderen arteriellen Gefäßverschlüssen sowie der Primär- und Sekundärprophylaxe thromboembolischer Komplikationen erfolgt in der Praxis nach unterschiedlichen Ansätzen. Beispielsweise bei der Behandlung des akuten koronaren Syndroms mit GPIIb/IIIa-Blockern. Die Langzeittherapie mit oralen Thrombozyten-Aggregationshemmern hat eine wesentliche Bedeutung bei der Behandlung von

Patienten mit Arteriosklerose sowohl im Rahmen der Sekundär- als auch der Primär-Prävention. Insbesondere zu erwähnen ist die Therapie mit dem Cyclooxygenasehemmer Acetylsalicylsäure (ASS). Die Therapie mit sogenannten ADP-Rezeptor-Antagonisten hat zunehmenden Eingang in die medizinische Praxis gefunden. Der Plättchenaktivator ADP wird beispielsweise von aktivierten Plättchen und roten Blutkörperchen freigesetzt. Er induziert die weitere Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. ADP-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. Clopidogrel oder nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAD) wie Diclofenac oder Ibuprofen, hemmen die nach Aktivierung von Plättchen normalerweise einsetzende ADP-Freisetzung bzw. die Bindung von ADP an dessen Rezeptor auf Thrombozyten und damit die ADP-induzierte Plättchenaggregation. Unerwünschte Wirkungen, wie gastrointestinale Nebenwirkungen (z.B. Durchfall, Übelkeit und Erbrechen), schwere gastrointestinale Blutungen, Neutropenien oder Thrombozytopenien, die bei einigen ADP-Rezeptor-Antagonisten beobachtet werden, verlangen nach alternativen Behandlungsstrategien.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, alternative Arzneimittel zur Primär- und Sekundärprophylaxe thromboembolischer Komplikationen, insbesondere von Herzinfarkt, Schlaganfall und anderen arteriellen Gefäßverschlüssen, bzw. zur allgemeinen Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen bereitzustellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Inhibitoren des Multidrug-Resistenzproteins 4 (MRP4) gelöst.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise festgestellt, dass in humanen Plättchen MRP4 (auch als ABC-Pumpe oder ABC-Transporter ABCC4 bezeichnet) exprimiert wird

und sowohl auf der extrazellulären Membran, als auch intrazellulär in Granula lokalisiert ist. Transportproteine, die die Akkumulation von ADP in den Granula vermitteln, sind bislang nicht bekannt. MRP4 wurde nunmehr als Transporter für ADP identifiziert.

Da in delta-Granula gespeichertes ADP eine zentrale Rolle bei der Selbstverstärkung der Plättchenaktivierung spielt, stellt die Inhibierung des MRP4-Transporterproteins einen neuen Ansatz zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen dar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung eines oder mehrerer Inhibitoren des Multidrug-Resistenzproteins 4 (MRP4) in Thrombozyten zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies schließt die Therapie, Primärprophylaxe und/oder Sekundärprophylaxe von akutem Coronarsyndrom, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit, sowie vor, während und nach Stent-Implantation in Gefäße, ein.

Als MRP4-Inhibitoren werden erfindungsgemäß z.B. Peptide, Peptidanaloga, Peptidomimetika und Cyclooxygenase-Inhibitoren, vor allem nicht-steroidale, antiinflammatorische Wirkstoffe, vorgeschlagen, die entweder direkt als Wirkstoff appliziert werden, oder als sogenannte „Prodrug“, aus der der Wirkstoff durch den körpereigenen Stoffwechsel entsteht. Ein anderer in Frage kommender Wirkstoff ist beispielsweise Dipyridamol.

Die Erkenntnis, dass MRP4 als ADP-Transporterprotein in Granula humaner Thrombozyten fungiert, kann nunmehr genutzt werden, um nach weiteren Wirkstoffen zu suchen.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Identifizierung einer Substanz, die das ADP-Transporterprotein MRP4 in Thrombozyten hemmt - d.h. eines Wirkstoffs zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen - bei dem man

- a) die zu untersuchende Substanz mit Thrombozyten in Kontakt bringt, einen Thrombozyten-Aktivator zugibt und man die Veränderung der Konzentration eines Aktivierungsmarkers im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mißt, die nicht mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt gebracht werden, und man
- b) in MRP4-enhaltenden Membran-Vesikeln oder Granula, die man ebenfalls mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt, die Veränderung der Radioaktivität von aufgenommenem [ $^3\text{H}$ ]cAMP oder [ $^3\text{H}$ ]cGMP oder markiertem ADP im Vergleich zu Membran-Vesikeln oder Granula mißt, die nicht mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt gebracht werden,

wobei die Substanz das ADP-Transporterprotein MRP4 in Thrombozyten hemmt, wenn die Substanz in a) und b) jeweils zu einer Verminderung des bestimmten Meßwerts führt. Die vorgenannten Bestimmungen unter a) und b) können selbstverständlich in beliebiger Reihenfolge durchgeführt werden. Zum initialen Screening kann auch die unter b) genannte Bestimmung zunächst alleine ausgeführt werden.

Ferner kann die Substanz zur weiteren Untersuchung ihrer Wirksamkeit in einem Schritt

- c) einem Versuchstier oder einem Probanden verabreicht werden, wobei man den ADP-Gehalt der Thrombozyten des

Versuchstiers oder des Probanden vor und nach Verabreichung der Substanz bestimmt.

Ein nach der bzw. durch die Behandlung abnehmender ADP-Gehalt weist auf eine MRP4-hemmende Wirkung der untersuchten Substanz hin.

Unter einer Substanz, die das ADP-Transporterprotein in Thrombozyten hemmt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Substanz verstanden, die geeignet ist, die ADP-Anreicherung in Granula zu vermindern, d.h. ganz oder teilweise zu blockieren. Dabei sind diese Substanzen nicht auf Stoffe mit einem bestimmten Wirkmechanismus beschränkt. Bei den Substanzen kann es sich um organisch-chemische Verbindungen ebenso wie um Oligopeptide oder Antikörper handeln.

Unter dem Begriff „Multidrug-Resistenzprotein 4 (MRP4)“ wird im Stand der Technik das humane MRP4-Genprodukt und dessen verschiedene Isoformen verstanden, ebenso wie Analoga, Homologe und Orthologe in anderen Spezies. Diese sollen auch erfindungsgemäß eingeschlossen sein. Das humane Gen, das für MRP4 kodiert, wurde zunächst teilweise kloniert und ist auf Chromosom 13 zu finden (GenBank Zugangsnummer U83660, Kool et al., Cancer Res. 57 (1997) 3537-3547).

Zur Durchführung des Verfahrens zur Identifizierung von MRP4-Inhibitoren können daher auch Thrombozyten aus nicht-humanen Quellen, wie z.B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Primaten, transgene Tiere, Knock-out Tiere, verwendet werden. Die so identifizierten Wirkstoffe sollten vorzugsweise anschließend hinsichtlich ihrer Wirkung an humanen Thrombozyten getestet werden.

Mit der vorliegenden Erfindung wird ferner ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen, einschließlich der Therapie, Primärprophylaxe und/oder Sekundärprophylaxe von akutem Coronarsyndrom, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit, sowie vor, während und nach Stent-Implantation in Gefäße, bereitgestellt, bei dem man ein vorgenanntes Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die das ADP-Transporterprotein MRP4 in Thrombozyten hemmen, durchführt und man die so identifizierten Substanzen mit pharmazeutisch akzeptablen Hilfs- und/oder Trägerstoffen formuliert.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung einer nach einem vorgenannten Verfahren zur Identifizierung einer das ADP-Transporterprotein MRP4 in Thrombozyten hemmenden Substanz zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Behandlung und/oder Prophylaxe der vorgenannten Erkrankungen.

Mit der erfindungsgemäß gewonnenen Erkenntnis, dass MRP4 in Granula humaner Thrombozyten als ADP-Transporter fungiert, werden alternative Protokolle zur Therapie, Primär- und/oder Sekundärprophylaxe der zuvor genannten Erkrankungen bereitgestellt. Durch Titration der Hemmung der ADP-Aufnahme ist eine individuelle Therapiesteuerung möglich. Durch Bestimmung des ADP-Gehaltes der Thrombozyten ist eine individuelle Messung der Wirkung des Medikamentes möglich. Dies ist bislang mit den bisherigen Substanzen, z.B. ADP-Rezeptor-Antagonisten, nicht möglich. Besteht die Notwendigkeit der invasiven Intervention, kann durch die Transfusion von Thrombozyten der Medikamenteneffekt antagonisiert werden. Dies ist bei GPIIb/IIIa-Antagonisten in

der Akutphase nicht ausreichend möglich, ebenso nicht bei den derzeitigen ADP-Rezeptor-Antagonisten, da die transfundierten Thrombozyten sofort vom Medikament gehemmt werden.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

## BEISPIELE

### Beispiel 1

Die Expression und intrazelluläre Lokalisierung von MRP4 in humanen Plättchen wurde durch Immunblotting und Immunfluoreszenzmikroskopie und einen funktionellen Assay nachgewiesen. In Immunblots zeigte der MRP4-spezifische Antikörper (Kaninchen) ein starkes Signal bei der erwarteten Molekularmasse von etwa 170kDa in Homogenaten isolierter Plättchen und wies auf eine MRP4-Anreicherung in Membranfraktionen hin, die über einen Saccharose-Dichtegradienten getrennt wurden.

Die MRP4-Funktion, die mit  $^3\text{H}$ -markiertem zyklischem GMP (cGMP), einem bekannten MRP4-Substrat, nachgewiesen wurde, konnte in Fraktionen niedriger Dichte, die die meisten Plasmamembranproteine enthalten, ebenso nachgewiesen werden wie in Fraktionen höherer Dichte, in denen intrazelluläre Granula vorlagen.

Immunfluoreszenzmikroskopie von Plättchen mit denselben Antikörpern zeigte eine Anreicherung von MRP4 in intrazellulären Granula und ein schwaches Signal an der Plasmamembran.



In doppelten Anfärbungsversuchen unterschieden sich MRP4-positive Granula von Granula, die gegenüber P-Selectin, das überwiegend auf Alpha-Granula exprimiert wird, positiv gefärbt waren. Die MRP4-positiven Granula zeigten jedoch eine Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs Mepacrin, von dem bekannt ist, dass er in Delta-Granula transportiert wird.

Zum Nachweis der Expression in Thrombozyten werden gewaschene Thrombozyten auf mit Kollagen beschichteten Glasplättchen inkubiert und adhärieren an diese. Alternativ können zu Kollagen beliebige andere Substanzen genommen werden, die an Glas oder Kunststoffoberflächen binden und an die Thrombozyten binden, oder die Thrombozyten werden direkt an eine Trägeroberfläche gebunden. Die Thrombozyten werden fixiert, z.B. mit 1% Paraformaldehydlösung, und die Zellmembran durch Chemikalien, z.B. Saponin, so geöffnet, dass auch nicht membrangängige Substanzen (Antikörper, Rezeptorbindungspartner) an intrazelluläre Strukturen binden können. Dann werden die Thrombozyten entweder mit einem direkt fluoreszenz-markierten Antikörper gegen MRP4 inkubiert, oder mit einem nicht-markiertem Antikörper und in einem zweiten Schritt mit einem markierten Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkennt, z.B. Ziege anti Kaninchen FITC markiert. Die Lokalisation der Antikörper-Bindung wird durch die Koinkubation mit einem monoklonalen oder polyklonalen Antikörper mit bekannter Spezifität für Markerproteine der Thrombozytengranula ermöglicht. Die Auswertung der Färbung erfolgt mit der Fluoreszenzmikroskopie.

Alternativ werden die Thrombozyten fixiert und mit direkt oder indirekt Gold-markierten Antikörpern gegen MRP4 inkubiert und die Bindung der Antikörper an Strukturen der dichten Granula nachgewiesen.

Um die Lokalisation weiter zu sichern, haben wir die Bindung von anti-MRP4 Antikörpern an Thrombozyten untersucht, die von einem Patienten mit Hermansky Pudlak Syndrom gewonnen wurden. Bei diesem Patienten sind die dichten Granula der Thrombozyten aufgrund einer genetischen Erkrankung nicht vorhanden, jedoch sind die anderen Thrombozytenorganellen (alpha Granula, Lysosomen) erhalten. Unter Verwendung der oben beschriebenen Methoden zeigte sich, dass die Thrombozyten, denen spezifisch die dichten Granula fehlen, kein MRP4 intrazellulär exprimieren, jedoch MRP4 auf der Thrombozyten-Oberfläche. Damit ist die Lokalisation eindeutig gesichert.

Für den Immunoblot werden Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit Standardmethoden solubilisiert und das Lysat auf einem Gel nach Standardmethoden entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt. Die Proteine im Gel werden nach Standardverfahren auf eine Nitrozellulosemembran überführt durch Anlegen eines Spannungsgradienten. Die Membran wird dann mit den primär oder sekundär markierten Antikörpern gegen MRP4 inkubiert und die Bindung der Antikörper sichtbar gemacht durch: Fluoreszenz, chemische Reaktion (Meerrettich-Peroxidase-Reaktion) oder durch radioaktive Markierung.

## Beispiel 2

### Messung der MRP4-Funktion in Thrombozyten-Membranen

Die Präparation der Membranvesikel und die Transportmessungen erfolgt in Anlehnung an die für MRP1 und Kulturzellen ausführlich beschriebene Methode von Keppler et al. (Methods Enzymol. 292 (1998) 607-616).

### Waschen der Thrombozyten

Aus den Thrombozytenkonzentraten werden rund 30ml Flüssigkeit in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von  $1300\times g$  für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wird das Pellet in 1 ml Lösung B (9,3 ml NaCl-Lösung (0.9%), 0,5 ml Lösung A (5g EDTA, ad 100 ml NaCl-Lösung (0,9%)), 0,2 ml Rinderalbumin-Lösung (22%)) resuspendiert und auf ein Volumen von 30ml mit Lösung B aufgefüllt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation bei  $1300\times g$  für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Das erhaltene Pellet wird in 1ml Lösung C (NaCl-Lösung (0,9%) mit 1xPBS pH 7,2 auf pH 6,5 einstellen) resuspendiert und auf ein Volumen von 30ml mit Lösung C aufgefüllt. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt, wobei beim letzten Waschen die Thrombozyten nur resuspendiert werden. Die Lagerung erfolgt dann in Aliquots von  $100\mu\text{l}$  bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Um die Erythrozytenkonzentration des Thrombozytenkonzentrates zu minimieren, wird das lockere, weiße Pellet der Thrombozyten nach der ersten Zentrifugation mit einer Pasteurpipette abgenommen und somit von den sich stärker absetzenden Erythrozyten getrennt.

### Zellaufschluss

#### Ultraschall

Diese Aufschlussmethode wird bei den gewaschenen Thrombozyten angewendet. Zu der Zellsuspension von einem Volumen von rund  $500\mu\text{l}$  werden die Stammlösungen der Proteaseinhibitoren Leupeptin, Aprotinin und Phenylmethylsulfonylfluorid jeweils im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgt mit dem Sonopuls-Gerät in einem Zyklus von  $5\times 10\text{s}$  bei einer Kraft von 50% mit Kühlpausen von 2 min zwischen den einzelnen Zyklen. Im

Anschluss erfolgt die Zentrifugation bei 100.000xg für 30 min bei 4°C. Das erhaltene Pellet wird in 50µl 5mM Tris-Lösung, pH 7,4 resuspendiert und der Proteingehalt bestimmt

#### Einfrieren/Auftauen

Die gewaschenen Thrombozyten liegen in einer Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von rund 500µl vor. Nach Zugabe der Stammlösungen der Protease-Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und PMSF im Verhältnis 1:1000 erfolgt der Aufschluss durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen im Wasserbad bei 37°C. Dieser Zyklus wird insgesamt fünfmal durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Zentrifugation bei 100.000x g für 30 min bei 4°C. Das erhaltene Pellet wird in 50µl 5mM Tris-Lösung, pH 7,4 resuspendiert, und es wird der Proteingehalt bestimmt.

#### Membranpräparation

##### Thrombozyten

Die durch den Zellaufschluss mit Hilfe von Einfrieren und Auftauen erhaltene Suspension ist frei von zytosolischen Proteinen und enthält somit die Plasmamembranen und weitere Zellorganellen, wie Mitochondrien und Granula. Sie wird wie folgt zu Membranvesikeln aufgearbeitet.

Die Membransuspension wird in den Dounce-Potter (tight) überführt und mit Tris-Sucrose-Puffer auf ungefähr das doppelte Volumen verdünnt. Anschließend erfolgt die Zugabe der Protease-Inhibitoren Leupeptin und Aprotinin im Volumenverhältnis der Stammlösung zur Suspension von 1:1000. Diese Protease-Inhibitoren sind kompetitive Inhibitoren, wohingegen PMSF, was schon während des Aufschlusses zugesetzt wurde, irreversibel hemmt.

Es werden daraufhin 30 Potter strokes durchgeführt, so dass ungefähr 2 strokes pro Minute erfolgen.

#### Membranpräparation ohne Sucrose-Gradient

Nach dem Homogenisationsprozess werden zwei Drittel der Suspension bei  $100.000\times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird in einem 4mal dem Pelletvolumen entsprechenden Volumen an Tris-Sucrose-Puffer resuspendiert, erneut in den Dounce-Potter (tight) überführt und mit 20 Potter strokes homogenisiert. Abschließend wird die Suspension 20mal durch eine 27G-Nadel aufgezogen, um so Membranvesikel, die insbesondere inside-out gerichtet sind, herzustellen. Die Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff als  $100\mu\text{l}$  Aliquots.

#### Membranpräparation mit Sucrose-Gradient

Nach dem Homogenisationsprozess wird ein Drittel der Suspension auf einen Sucrosegradienten gegeben. Die 4ml fassenden Röhrchen, die zu dem swing-out-Rotor SW55 der Beckman-Zentrifuge gehören, werden wie folgt beladen. Zuerst werden 1,5 ml einer 60%igen Sucrose-Lösung in 5mM HEPES, pH 7,4 (m/m) hineingegeben. Dann werden 1,5 ml einer 30%igen Sucrose-Lösung in 5mM HEPES, pH 7,4 (m/m) hinzugegeben. Über diese beiden Sucrose-Lösungen werden 0,5 ml der Membransuspension geschichtet. Die anschließende Zentrifugation mit dem swing out Rotor erfolgt bei  $200.000\times g$  für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### Transportmessung

Die Grundlage der verwendeten Methode sind Membranvesikel, die durch Scherkräfte beim Aufziehen mit einer möglichst dünnen Nadel entstehen. Die Herstellungsweise der Membranvesikel bringt auch immer einen gewissen Anteil (rund 30%) an inside-out Membranvesikeln hervor. Das Besondere der inside-out

Membranvesikel ist, dass die Membran umgekehrt zur Plasmamembran ausgerichtet ist. Ein Auswärtstransporter der Plasmamembran würde in einem inside-out Vesikel nach innen transportieren. Da weiterhin das MRP4 in der Plasmamembran vorliegt, bieten inside-out Vesikel die Möglichkeit eines Funktionstests. Außerdem existieren in Thrombozyten und anderen Zellen Vesikel im Zytoplasma, die durch Abschnürungen der Plasmamembran entstehen und ebenfalls inside-out ausgerichtet sind und folglich durch Transportprozesse Stoffe aufnehmen könnten.

Zu den inside-out Vesikeln wird ein Tritium-markiertes Substrat gegeben, was ATP-abhängig transportiert werden kann. Durch Messung in Gegenwart von AMP und ATP (ATP erhaltender Creatinkinase) wird einmal der ATP-abhängige Einwärtstransport messbar, von dem der AMP-Wert, der Diffusionsprozesse widerspiegelt, abgezogen wird.

Die in den inside-out Vesikeln befindlichen Substanzen werden auf einen Filter mit einem Durchmesser von  $0,22\mu\text{m}$  gegeben, so dass durch Waschen überschüssige Radioaktivität entfernt wird. Über Zählung der radioaktiven Zerfälle auf den Filtern wird das Ergebnis detektiert (siehe Fig. 1).

Die Transportversuche wurden mit  $[^3\text{H}]\text{-cGMP}$  (Tritium-markiertes cGMP) durchgeführt.

Pro Ansatz werden  $100\mu\text{g}$  Protein der Membranvesikelsuspension mit Tris-Sucrose-Puffer auf  $55\mu\text{l}$  verdünnt. In einem zweiten Ansatz werden  $7,5\mu\text{l}$  Creatinkinase,  $6,8\mu\text{l}$  ATP oder AMP und  $7,5\mu\text{l}$  einer  $[^3\text{H}]\text{-cGMP}$ -Stammverdünnung, für die  $[^3\text{H}]\text{-cGMP}$  ( $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) im Verhältnis 2:5 mit Tris-Sucrose-Puffer verdünnt wird. Die Endkonzentration des  $[^3\text{H}]\text{-cGMP}$  entspricht  $4\mu\text{M}$  bei einer Radioaktivität von  $2,7\mu\text{Ci} / 75\mu\text{l}$ .

Die 55  $\mu\text{l}$  der Membransuspension und der radioaktive Ansatz werden gleichzeitig eine Minute bei 37 °C im Thermoschüttler erwärmt, bevor man 20  $\mu\text{l}$  des radioaktiven Ansatzes in die Membransuspension pipettiert und so den Transportversuch startet. Während der Inkubation im Thermoschüttler bei 37°C werden nach 1, 10 und 20 min jeweils 20  $\mu\text{l}$  Proben gezogen. Die entnommenen Proben pipettiert man in 1ml eisgekühlte Tris-Sucrose-Lösung, wobei das Gesamtvolumen sofort auf einen Nitrocellulosefilter gegeben wird. Durch Spülen mit 5 ml kalter Tris-Sucrose-Lösung bei angelegtem Vakuum entfernt man die freie Radioaktivität. Die einzelnen Filter werden in Vials überführt und 10 ml Szintillationsflüssigkeit (z.B. Firma Roth, Zinsser) hinzugegeben. Diese Flüssigkeit wandelt die vorhandene Radioaktivität in ein auswertbares Lichtsignal um, welches mit dem *Wallac 1409 Liquid Scintillation counter* und einem speziellen Tritium-Zählprogramm als DPM (decays per minute = Zerfälle pro Minute) gemessen werden kann.

#### Berechnung

[ <sup>3</sup> H] -cGMP:	8,8 Ci/mmol = 8,8 $\mu\text{Ci/nmol}$
	1 $\mu\text{Ci} \equiv 2,2 \times 10^6$ DPM
	1 nmol $\equiv 8,8 \times 2,2 \times 10^6$ DPM
	0,05 pmol $\equiv 1000$ DPM
Protein:	100 $\mu\text{g}$ / 75 $\mu\text{l}$
	26,7 $\mu\text{g}$ / 20 $\mu\text{l}$ (Probenvolumen)
bezogen auf 1 mg	1000 DPM $\equiv 1,87$ pmol / mg
Protein:	

### Beispiel 3

#### Hemmung des Transports:

Bei dem Test potentieller Hemmstoffe werden diese in verschiedenen Konzentrationen der Inkubation zusammen mit dem markierten Substrat zugegeben. Eine Identifizierung als Hemmstoff ist dann gegeben, wenn die Transportrate des markierten Substrates in Mehrfach-Bestimmungen statistisch signifikant (z.B. Students T-Test) gegenüber der Kontroll-Inkubation ohne Hemmstoff erniedrigt ist.

### Beispiel 4

#### Identifizierung von MRP4-inhibierenden Substanzen durch Messung der Thrombozytenfunktion

##### A. Thrombozyten-Aggregation nach Born

Die Thrombozytenfunktion nach Hemmung des MRP4 Transporters kann mit Thrombozyten-Aggregation nach Born (Platelets. In: Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2. Ed. Biggs, Editor Blackwell Scientific Publications, London 1976, S. 168-201) gemessen werden. Dabei setzt man Thrombozyten einen Thrombozyten-Aktivator zu und misst die Veränderung der Konzentration eines Aktivierungsmarkers. Der Versuch wird unter identischen Bedingungen wiederholt, wobei man die Thrombozyten aber mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt, bevor man den Thrombozytenaktivator zugibt. Die bei beiden Versuchen erhaltenen Messwerte werden verglichen, wobei die Substanz auf einen MRP4-Hemmstoff hinweist, wenn die Zugabe der Testsubstanz gegenüber dem Thrombozyten-Aggregationstest ohne Testsubstanz zu einer Verminderung des bestimmten Meßwerts führt.



Nachfolgend wird das Prinzip der Thrombozyten-funktionsuntersuchung mittels Aggregometrie nach Born beschrieben.

Messmethode: Turbidimetrie

Gerät: 4-Kanal-Aggregometer „APACT 4“ (Fa. Laborgeräte + Analysensysteme Vertriebsgesellschaft mbH, Ahrensburg, Deutschland)

Induktoren: ADP , Kollagen, Ristocetin, Adrenalin

Durchführung:

#### 1. Induktoren:

Die Induktoren liegen als Lyophilisate vor und werden gemäß Angaben der Hersteller zur Anwendung vorbereitet und können bis zum Gebrauch in Aliquots bei unter  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

Folgende Induktor-Konzentrationen (Endkonzentrationen) werden verwendet:

ADP ( $2,5\text{ }\mu\text{mol/l}$ ,  $5\text{ mmol/l}$ ,  $10\text{ mmol/l}$ ,  $20\text{ mmol/l}$ )

Kollagen ( $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ,  $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ )

Ristocetin ( $0,5\text{ mg/ml}$ ;  $1,5\text{ mg/ml}$ )

Adrenalin ( $5\text{ }\mu\text{mol/l}$ ,  $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ )

Die Induktoren werden kurz vor Gebrauch aufgetaut, kräftig gemischt (Vortexer) und während des Gebrauchs bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf Eis gelagert (Adrenalin lagert während der Durchführung bei Raumtemperatur).

#### 2. Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP):

Von einem gesunden Blutspender wird zunächst PRP mittels Differentialzentrifugation einer Zitrat-antikoagulierten,

frisch entnommenen Vollblutprobe gewonnen (20 min, 120 x g)..  
Der Spender soll 10 Tage vor der Blutentnahme keine die  
Thrombozytenfunktion beeinträchtigenden Medikamente  
eingenommen haben.

Das PRP wird in ein sauberes Poly-Röhrchen überführt und mit  
PPP desselben Spenders, welches aus PRP durch hochtourige  
Zentrifugation gewonnen wird (5 min, 860 x g), auf eine  
Thrombozytenzahl von 300.000/ $\mu$ l eingestellt. Das eingestellte  
PRP wird bis zum Gebrauch bei 37°C aufbewahrt, das Röhrchen  
wird mit Parafilm verschlossen.

### 3. Geräteeinstellungen und Messung:

#### a) Einstellungen am APACT

600 sec. Meßzeit, Rührgeschwindigkeit 1000 rpm, Temperatur  
des Heizblockes 37°C.

Aufwärmzeit des Gerätes ca. 10 bis 15 min..

#### b) Eichung des Gerätes mit PPP

180  $\mu$ l PPP werden mit 20  $\mu$ l 0,9 % iger NaCl-Lösung pH 7,2  
in der mit einem Rührmagneten versehenen Küvette gemischt,  
in den Meßkanal gestellt und gemessen (entspricht 100 %  
Lichtdurchlässigkeit).

#### c) Eichung des Gerätes mit PRP

180  $\mu$ l PRP werden mit 20  $\mu$ l 0,9 % iger NaCl-Lösung pH 7,2  
in der mit einem Rührmagneten versehenen Küvette gemischt,  
in den Meßkanal gestellt und gemessen (entspricht 0 %  
Lichtdurchlässigkeit).

#### d) Messung

Eine saubere, mit einem Rührmagneten versehene Küvette  
wird erneut mit 180  $\mu$ l PRP blasenfrei gefüllt. Der

Meßkanal wird gestartet, die Aufzeichnung der Messung der Lichtdurchlässigkeit kann am PC verfolgt werden. Nach ca. 1 min. wird in die PRP-gefüllte Küvette 20  $\mu$ l einer der o.g. Induktoren pipettiert (blasenfrei, die Küvette nicht aus dem Meßkanal entfernen; darauf achten, dass der Induktor nicht am Rand der Küvette hängen bleibt!). Der Verlauf der Kurve wird kontinuierlich aufgezeichnet. Die Lichtdurchlässigkeit (%) des PRP steigt mit der Zunahme der aggregierten Thrombozyten über die Zeit an.

Die Küvette wird nach Ende der Meßzeit aus dem Meßkanal entfernt. Die Messungen werden dann, wie unter b) bis d) beschrieben, für jeden weiteren Induktor wiederholt. Zur Messung der Spontan-Aggregation der Thrombozyten werden anstelle des Induktors 20  $\mu$ l physiologische NaCl-Lösung in das PRP pipettiert und die Messung durchgeführt.

#### 4. Qualitätskontrolle:

Die Messung der Funktion der Thrombozyten eines gesunden Normalprobanden dient als Kontrolle der Beschaffenheit der Induktoren und der Funktionstüchtigkeit des Aggregometers. Die Messung der Thrombozytenfunktion von z.B. Probanden mit V.a. Thrombozytopathie erfolgt anschließend.

Die zu untersuchenden, potentiellen MRP4-Inhibitoren werden - wie oben erwähnt - den Küvetten vor Zugabe der jeweiligen Induktoren zugesetzt.

Zur Untersuchung, ob die zu untersuchende Substanz spezifisch auf das MRP4 Transporterprotein wirkt, werden die in Beispiel 3 beschriebenen Vesikel-Transportstudien durchgeführt.

## B. Expression von Aktivierungsmarkern in der Durchflußzytometrie

Die Thrombozytenfunktion nach Hemmung des MRP4 Transporters kann ferner durch Expression von Aktivierungsmarkern (z.B. PAC-1, CD 63, P-Selectin) in der Durchflußzytometrie bestimmt werden.

Die Durchflußzytometrie stellt ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen anhand der Größe und Granularität dar. Sie dient darüber hinaus der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern.

Die markierten, in Suspension vorliegenden, Zellen werden einzeln an einem Argonlaser vorbeigeführt (vgl. Fig. 2). Das daraus resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Fotodetektoren erfasst. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom FSC-Detektor (*Forward Scatter*, FSC) aufgenommen und gibt Auskunft über die Größe der gemessenen Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) korreliert mit der Granularität der Zelle. Über verschiedene weitere Detektoren werden zusätzliche Eigenschaften der Zellen, wie zum Beispiel die Expression eines oder mehrerer Oberflächenmoleküle, registriert. Für jede einzelne Zelle wird die Intensität und Farbe der Fluoreszenz von einem Computer erfasst. Die Signale der Fotodetektoren werden über Fotomultiplier verstärkt. Die Analyse der entsprechenden Daten erfolgt mit Hilfe des Computer-Programms WinMDI 2,8.

Aktivierte und ruhende Thrombozyten unterscheiden sich morphologisch voneinander. Aktivierte Thrombozyten zeichnen sich durch die Bildung von Mikropartikeln und großen Thrombozytenaggregaten aus, was zu einer Verschiebung der Thrombozyten im FSC / SSC führt (Matzdorff et al. 1998, J. Lab. Clin. Med. 131(6):507-17).

Ruhende Thrombozyten zeigen hingegen eine einheitliche Größe und bilden daher eine definierte Punktwolke bei Betrachtung von Größe und Granularität im Durchflusszytometer. Neben der Veränderung der Form der Thrombozyten kommt es zur Oberflächenexponierung von P-Selektin.

Zur Fixierung werden 100  $\mu$ l Thrombozytensuspension in 1 ml Formaldehydlösung pipettiert. Nach zwei Stunden bis maximal vier Tagen werden die Thrombozyten für die Färbung zweimal mit FACS-Flow gewaschen (1700  $\times$  g, 5 min). Das Pellet wird in 500  $\mu$ l FACS-BSA-Gemisch resuspendiert und 25  $\mu$ l der Probe mit 10  $\mu$ l Antikörper (P-Selektin, Maus, unmarkiert) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird der Ansatz einmal mit FACS-Flow gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes werden 10  $\mu$ l Sekundärantikörper (anti-Maus, FITC-markiert, 1:30 verdünnt) zu den Thrombozyten gegeben. Die Proben werden bei Raumtemperatur 30 min im Dunkeln inkubiert. Für die Messung werden die Thrombozyten einmal gewaschen und dann in 1 ml FACS-Flow aufgenommen.

Die Messungen erfolgen analog der Untersuchung der Thrombozyten-Aggregation nach Born (s. unter A) durch Thrombozytenaktivierung jeweils im Vergleich mit und ohne zu untersuchende Substanz, wobei die Substanz auf einen MRP4-Hemmstoff hinweist, wenn die Zugabe der Testsubstanz gegenüber der Messung ohne Testsubstanz zu einer geringeren Thrombozytenaktivierung und damit zu einer Verschiebung des FSC /SCC-Verhältnisses in Richtung FSC führt.

Zur Untersuchung, ob die zu untersuchende Substanz spezifisch auf das MRP4 Transporterprotein wirkt, werden die in Beispiel 3 beschriebenen Vesikel-Transportstudien durchgeführt.

### C. Lumiaggregometrie

Die Thrombozytenfunktion nach Hemmung des MRP4 Transporters kann ferner durch Lumiaggregometrie bestimmt werden. Dabei misst man die Freisetzung von ADP/ATP in der Lumiaggregometrie mittels Luciferin-Luciferase Test (vgl. Mondoro et al., Blood 96 (2000) 2487-2495 sowie White et al., Thromb. Haemost. 67 (1992) 572).

Die Messungen erfolgen analog der Untersuchung der Thrombozyten-Aggregation nach Born (s. unter A) oder der Durchflußzytometrie (vgl. unter B) durch Thrombozytenaktivierung jeweils im Vergleich mit und ohne zu untersuchende Substanz, wobei die Substanz auf einen MRP4-Hemmstoff hinweist, wenn die Zugabe der Testsubstanz gegenüber der Messung ohne Testsubstanz zu einer geringeren Thrombozytenaktivierung und damit zu einem geringeren Lumineszenzwert führt.

Der Versuch wird unter identischen Bedingungen wiederholt, wobei man die Thrombozyten aber zuvor mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt.

Die bei beiden Versuchen erhaltenen Messwerte werden verglichen, wobei die Substanz auf einen MRP4-Hemmstoff hinweist, wenn die Zugabe der Testsubstanz gegenüber der Lumiaggregometrie ohne Testsubstanz zu einer Verminderung der Freisetzung von ADP/ATP führt.

Zur Untersuchung, ob die zu untersuchende Substanz spezifisch auf das MRP4 Transporterprotein wirkt, werden die in Beispiel 3 beschriebenen Vesikel-Transportstudien durchgeführt.

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Inhibitors des Multidrug-Resistenzproteins 4 (MRP4) in Thrombozyten zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen die Therapie, Primärprophylaxe und/oder Sekundärprophylaxe von akutem Coronarsyndrom, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit vor, während und nach Stentimplantation in Gefäße ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein Peptid, ein Peptidanalogen oder ein Peptidomimetikum ist.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Inhibitor ein Cyclooxygenase-Inhibitor ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Cyclooxygenase-Inhibitor ein nicht-steroidaler, antiinflammatorischer Wirkstoff ist.
6. Verfahren zur Identifizierung einer Substanz, die das ADP-Transporterprotein MRP4 in Thrombozyten hemmt, dadurch gekennzeichnet, dass man
  - a) die zu untersuchende Substanz mit Thrombozyten in Kontakt bringt, einen Thrombozyten-Aktivator zugebt

und man die Veränderung der Konzentration eines Aktivierungsmarkers im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten misst, die nicht mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt gebracht werden, und man

- b) in MRP4-enthaltenden Membran-Vesikeln oder Granula, die man ebenfalls mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt, die Veränderung der Radioaktivität von aufgenommenem [ $^3\text{H}$ ]cAMP oder [ $^3\text{H}$ ]cGMP im Vergleich zu Membran-Vesikeln oder Granula misst, die nicht mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt gebracht werden,

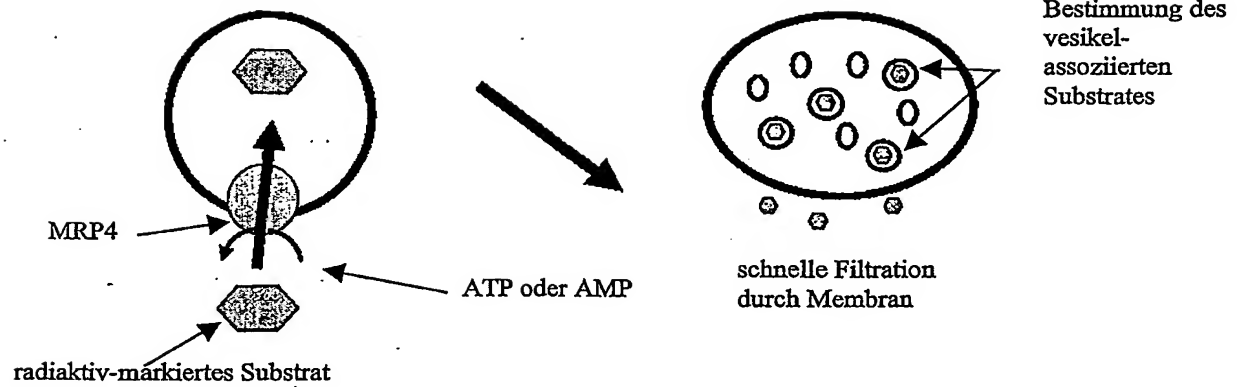
wobei die Substanz das ADP-Transporterprotein MRP4 in Thrombozyten hemmt, wenn die Substanz in a) und b) jeweils zu einer Verminderung des bestimmten Messwerts führt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man a) und b) in beliebiger Reihenfolge durchführt.
8. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Verfahren nach Anspruch 6 oder 7 durchführt und man die identifizierten Substanzen mit pharmazeutisch akzeptablen Hilfs- und/oder Trägerstoffen formuliert.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen die Therapie, Primärprophylaxe und/oder Sekundärprophylaxe von akutem Coronarsyndrom, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer

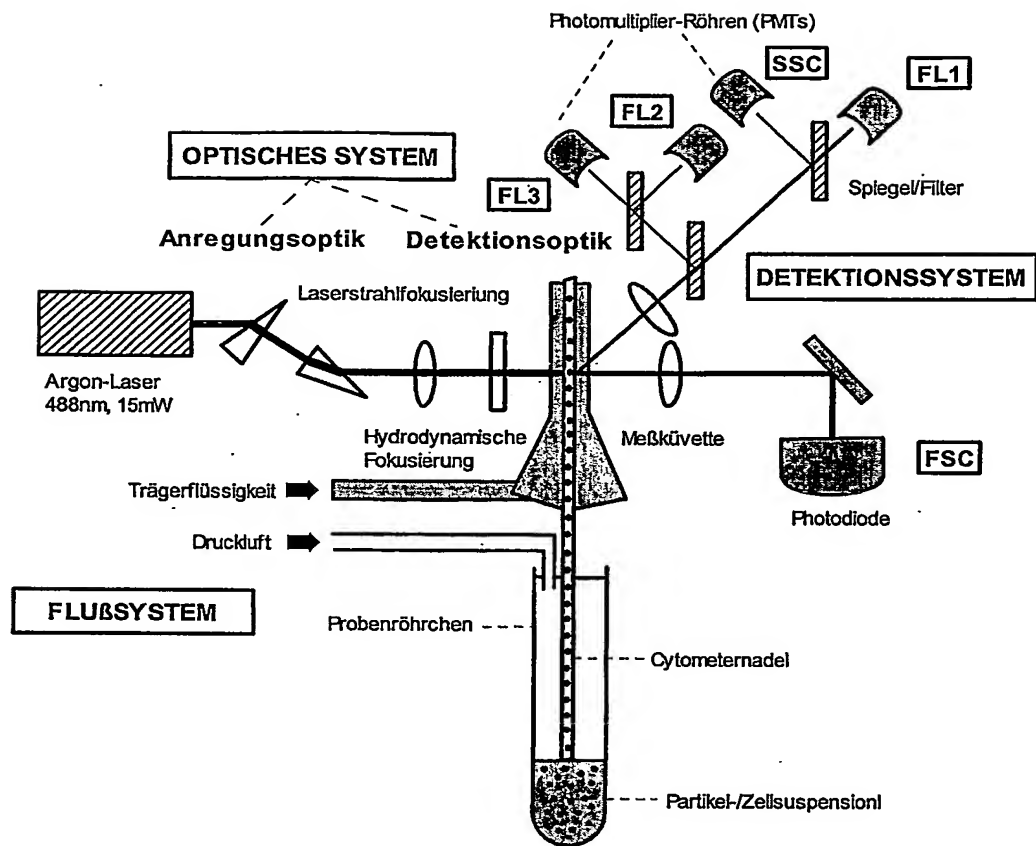


arterieller Verschlusskrankheit vor, während und nach Stentimplantation in Gefäße ist.

10. Verwendung einer nach einem Verfahren der Ansprüche 6 und 7 identifizierten Substanz zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen.
11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen die Therapie, Primärprophylaxe und/oder Sekundärprophylaxe von akutem Coronarsyndrom, Angina Pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit vor, während und nach Stentimplantation in Gefäße ist.



**Fig. 1:** Prinzip der Transportmessung mit inside-out Membranvesikeln



**Figur 2:** Aufbau eines Durchflusszytometers (vereinfachte schematische Darstellung)

### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren des Multidrug-Resistenzproteins 4 (MRP4) in Thrombozyten zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen.